

Особенности субпопуляционного состава мобилизованных стволовых кроветворных клеток у больных с опухолями кроветворной системы и доноров: экспрессия антигенов CD38, HLA-DR и CD143

М.Л. Канаева, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова, Ю.О. Давыдова, Т.В. Гапонова, Е.О. Грибанова, Я.Б. Бальжанова, Л.А. Кузьмина, В.В. Троицкая, С.К. Кравченко, Е.Е. Звонков, Л.П. Менделеева, В.Г. Савченко
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Мадина Лечиевна Канаева madinasatto@gmail.com

Цель исследования – изучение особенностей субпопуляционного состава пула мобилизованных стволовых кроветворных клеток в периферической крови (ПК) и лейкоконцентраатах (ЛК) у взрослых больных с онкогематологической патологией и доноров.

Материалы и методы. Экспрессию CD38, HLA-DR и CD143 (ангиотензинпревращающий фермент) определяли в клетках CD34⁺CD45^{low} ПК и ЛК у 80 больных гемобластомами. В контрольную группу включены 10 образцов ПК и 14 образцов ЛК здоровых доноров. Исследование ПК проводили до мобилизации стволовых кроветворных клеток (СКК) и в день лейкофереза до процедуры сбора СКК. Образцы ЛК исследовали в 1-й день сбора СКК.

Результаты. Показано, что CD143 экспрессируется на клетках CD34⁺CD45^{low} как перед мобилизацией, так и после нее у всех пациентов и доноров, но количество клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ различалось в зависимости от диагноза и режимов мобилизации. Экспрессия CD143⁺ на клетках CD34⁺CD45^{low} была статистически значимо больше у больных, которым применяли режимы, сочетающие химиотерапию и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, чем у доноров и больных множественной миеломой, у которых использовали гранулоцитарный колониестимулирующий фактор в монорежиме. Наряду с повышением содержания клеток CD34⁺CD45^{low} после стимуляции кроветворения увеличивалось количество клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺. Показано, что среди мобилизованных СКК практически отсутствует фракция ранних клеток-предшественниц CD34⁺CD45^{low}, не экспрессирующая CD38, HLA-DR. Перед стимуляцией кроветворения среди клеток крови CD34⁺CD45^{low} преобладают фракции клеток CD38⁺HLA-DR⁻, тогда как после мобилизации увеличилось содержание клеток CD38⁻HLA-DR⁺. Не установлены различия между содержанием клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ у больных множественной миеломой в зависимости от статуса заболевания, пола, возраста и количества курсов химиотерапии, предшествующих мобилизации СКК.

Заключение. Выявлена экспрессия ангиотензинпревращающего фермента на клетках CD34⁺ в ПК до и после мобилизации СКК и в ЛК. Количество этих клеток различалось в зависимости от диагноза и режимов мобилизации.

Ключевые слова: стволовые кроветворные клетки, субпопуляция, экспрессия CD34, CD38, HLA-DR, ангиотензинпревращающий фермент (CD143)

Для цитирования: Канаева М.Л., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. и др. Особенности субпопуляционного состава мобилизованных стволовых кроветворных клеток у больных с опухолями кроветворной системы и доноров: экспрессия антигенов CD38, HLA-DR и CD143. Онкогематология 2019;14(2):48–58.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-2-48-58

Subpopulations of mobilized hematopoietic stem cells in patients with hematological malignances and donors: expression of CD38, HLA-DR and CD143

M.L. Kanaeva, I.V. Galtseva, E.N. Parovichnikova, Yu.O. Davydova, T.V. Gaponova, E.O. Gribanova, Ya.B. Balzhanova, L.A. Kuzmina, V.V. Troitskaya, S.K. Kravchenko, E.E. Zvonkov, L.P. Mendeleeva, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

The study objective is to investigate the features of subpopulational composition of mobilized hematopoietic stem cells in peripheral blood (PB) and leukocyte concentrates (LC) in adult patients with oncohematological pathology and donors.

Materials and methods. In 80 patients with hemoblastoses, expression of CD38, HLA-DR and CD143 (angiotensin-converting enzyme) was measured in PB and LC CD34⁺CD45^{low} cells. The control group included 10 PB and 14 LC samples from healthy donors. Analysis of PB was performed prior to mobilization of hematopoietic stem cells (HSC) and on the day of leukapheresis prior to HSC collection. LC samples were examined at day 1 after HSC collection.

Results. CD143 is expressed on CD34⁺CD45^{low} cells both prior to mobilization and after it in all patients and donors, but CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ cell counts varied depending on diagnosis and mobilization regimen. CD143⁺ expression on CD34⁺CD45^{low} cells was significantly higher in patients who received combination of chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor compared to donors and patients with multi-

ple myeloma who received only granulocyte colony-stimulating factor. Along with elevated $CD34^+CD45^{low}$ cell count after hematopoiesis stimulation, $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ cell counts also increased. It was shown that mobilized HSC almost completely lacks a fraction of early $CD34^+CD45^{low}$ progenitor cells not expressing CD38, HLA-DR. Prior to hematopoiesis stimulation among $CD34^+CD45^{low}$ cells, $CD38^+HLA-DR^-$ cell fractions are prevalent, but after mobilization $CD38^+HLA-DR^+$ cell counts increased. No differences between $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ cell counts in patients with multiple myeloma depending on disease status, sex, age or number of chemotherapy courses prior to HSC mobilization were observed.

Conclusion. Expression of angiotensin-converting enzyme on $CD34^+$ cells in PB before and after HSC mobilization and in LC was observed. The cell counts varied depending on diagnosis and mobilization regimen.

Key words: hematopoietic stem cells, subpopulation, CD34, CD38, HLA-DR expression, angiotensin-converting enzyme (CD143)

For citation: Kanaeva M.L., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. et al. Subpopulations of mobilized hematopoietic stem cells in patients with hematological malignances and donors: expression of CD38, HLA-DR and CD143. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2019;14(2):48–58.

Введение

Начало исследования по изучению иммунофенотипического профиля стволовых кроветворных клеток (СКК) было положено с момента открытия и подробного описания антигена CD34 [1], который является общим маркером СКК всех этапов дифференцировки: от ранних до унипотентных. Количество клеток $CD34^+$ в периферической крови (ПК) отражает эффект мобилизации СКК и считается наиболее точным критерием эффективности проведения процедуры сбора мобилизованных периферических стволовых клеток в целях дальнейшей трансплантации [2].

Независимо от плотности экспрессии CD34 на мембране клеток-предшественниц, именно суммарный пул клеток $CD34^+$ определяет сроки восстановления кроветворения после аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [3]. В качестве минимальной дозы клеток $CD34^+$, способных обеспечить восстановление гемопоэза после высокодозной химиотерапии (ХТ), установлено 2×10^6 клеток на 1 кг массы тела больного [4].

Экспрессия общелейкоцитарного антигена CD45 характерна для всех гемопоэтических клеток, включая ранние, морфологически незрелые формы. Исключением являются зрелые эритроциты, тромбоциты и плазматические клетки [5]. Известно, что интенсивность экспрессии панлейкоцитарного антигена CD45 представлен на всех СКК по-разному, по мере дифференцировки клеток его экспрессия нарастает от практически отрицательной до слабой, соответствующей уровню экспрессии антигена на гранулоцитах. В основу стандартных цитометрических протоколов для подсчета абсолютного количества стволовых гемопоэтических клеток положена оценка клеток $CD34^+$ в пределах популяции со слабой или очень слабой экспрессией CD45 [6].

На основании экспрессии ряда антигенов на мембране клеток $CD34^+$ можно судить о субпопуляционном составе СКК, т. е. о присутствии среди них полипотентных и линейно коммитированных клеток. Не существует однозначных маркеров для оценки ранних СКК. Для определения этой малой клеточной субпопуляции было использовано сочетание

антигенов CD38 и HLA-DR. Отсутствие экспрессии CD38 и HLA-DR на популяции клеток $CD34^+$ характеризует субпопуляцию наиболее ранних кроветворных клеток с неограниченным потенциалом пролиферации и дифференцировки. При снижении плотности антигена CD34 отмечается увеличение плотности антигена CD38 [7–9]. Наряду с этим большинство клеток популяции $CD34^+CD38^-$ является $HLA-DR^+$ и, напротив, большинство клеток $CD34^+HLA-DR^-$ экспрессирует антиген CD38. Функционально данные популяции СКК также являются различными. Клетки $CD34^+CD38^-HLA-DR^+$ демонстрируют свойства истинно СКК с высоким потенциалом пролиферации и дифференцировки.

В настоящее время активно исследуется влияние ренин-ангиотензиновой системы на пролиферативную активность клеток костного мозга. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) CD143 играет ключевую роль в классической ренин-ангиотензиновой системе, в которой ренин запускает продукцию ангиотензина I из ангиотензиногена, а затем АПФ расщепляет ангиотензин I до ангиотензина II [10]. При оценке методом полимеразной цепной реакции АПФ был обнаружен во всех протестированных 72 тканях человеческого организма с самой высокой распространенностью в эндотелии [11]. V.J. Jokubaitis и соавт. в 2008 г. подтвердили, что АПФ экспрессируется на человеческих эмбриональных клетках и клетках взрослых гемопоэтических органов, включая аорту, печень плода и пуповинную кровь. В человеческом организме до формирования СКК и сосудистой стенки аорты на некоторых клетках эмбриона $CD34^-CD45^-$ обнаружена экспрессия АПФ. Также в результате трансплантации мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD/SCID) было продемонстрировано, что печеночные и костномозговые клетки-предшественницы, экспрессирующие $CD34^+CD143^+$, обладают более длительным пролиферативным потенциалом в отличие от клеток $CD34^+$, не экспрессирующих CD143 [12].

В ряде случаев трансплантация адекватного количества клеток $CD34^+$ не приводит к полноценному трехростковому восстановлению кроветворения.

Иногда после восстановления гемопоэза отмечаются повторные отсроченные цитопении, приводящие к серьезным инфекционным осложнениям. Примерно 10 % случаев трансплантаций сопровождается длительными тромбоцитопениями (30 дней и более) [13].

При более детальном изучении субпопуляционно-го состава трансплантируемых мобилизованных СКК, возможно, удастся ответить на ряд вопросов, касающихся посттрансплантационного восстановления кроветворения.

Цель исследования – изучение особенностей субпопуляционного состава пула мобилизованных СКК в ПК и лейкоконцентратах (ЛК) у взрослых больных с онкогематологической патологией и доноров.

Материалы и методы

Исследование субпопуляций СКК проведено в ПК и ЛК у 80 больных гемобластозами. В исследование были включены 53 больных множественной миеломой (ММ) в возрасте 19–67 лет (медиана 54 года), 20 больных лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами в возрасте 19–67 лет (медиана 43 года), 7 больных острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ) в возрасте 19–62 лет (медиана 34 года). В контрольную группу вошли 24 здоровых донора. Изучили 14 образцов ЛК доноров для неродственной аллогенной трансплантации и 10 образцов ПК добровольцев. Мобилизацию и сбор СКК всем больным проводили в НМИЦ гематологии.

Перед сборами СКК пациентам проводили курс стимуляции кроветворения. В большинстве случаев использовали сочетание ХТ с последующим введением ростовых факторов кроветворения в дозировке 5–10 мкг на 1 кг массы тела больного. Во всех случаях для мобилизации СКК был использован гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Введение препарата продолжали в течение 3–12 дней до завершения сбора СКК. Перед процедурой лейкофереза определяли количество клеток $CD34^+$, циркулирующих в ПК, и при содержании 10 клеток $CD34^+$ и более в 1 мкл выполняли сбор СКК. Проводили от 1 до 5 сеансов лейкофереза в зависимости от эффективности стимуляции кроветворения и мобилизации СКК. Количество собранных за все процедуры лейкофереза клеток $CD34^+$ варьировало от $0,7 \times 10^6$ до $33,5 \times 10^6$ на 1 кг массы тела, в среднем – $(7,99 \pm 0,64) \times 10^6$ на 1 кг массы тела.

Химиотерапевтические режимы, предшествующие введению ростовых факторов, различались в зависимости от диагноза больного. При мобилизации СКК у 40 больных ММ использовали циклофосфамид в дозе 4 мг/м² с последующим введением Г-КСФ, у 9 больных СКК были мобилизованы с помощью Г-КСФ в монорежиме (в эту группу вошли больные ММ с почечной недостаточностью), 4 пациентам проводили различные курсы ХТ с последующим введением Г-КСФ. Всем пациентам с Т-ОЛЛ

мобилизацию СКК проводили с помощью Г-КСФ, на фоне предшествующей терапии по протоколу ОЛЛ-2009 после курса консолидации III или IV на не сниженных показателях ПК. При лимфоме Ходжкина использовали схемы R-DHAP (ритуксимаб, дексаметазон, высокодозный цитарабин, цисплатин) и циклофосфамид. При неходжкинских лимфомах у большинства больных применяли протокольный режим ХТ, включающий комбинацию нескольких химиопрепаратов (циклофосфамид, DHAP, R-DHAP, R-DA-EPOCH, R-NHL-BFM-90, TL-REZ, R-NMA) с последующим введением Г-КСФ.

Варианты мобилизации и сбора образцов представлены на рис. 1.

Среднее количество курсов ХТ до момента сбора СКК у больных ММ составило 8 (3–16), у больных лимфомами – 6 (1–9), у больных Т-ОЛЛ – 6 (5–6).

На момент начала лейкофереза у большинства больных был достигнут положительный ответ на проведенную терапию. Клинико-диагностическая характеристика больных представлена в табл. 1.

Образцы ПК больных исследовали до мобилизации, перед введением химиопрепаратов и/или Г-КСФ и в день лейкофереза до процедуры сбора СКК. Образцы ЛК исследовали в 1-й день сбора СКК. Анализировали следующие субпопуляции СКК: $CD34^+CD45^{low}CD38^-HLA-DR^-$, $CD34^+CD45^{low}CD38^-HLA-DR^+$, $CD34^+CD45^{low}CD38^+HLA-DR^-$, $CD34^+CD45^{low}CD38^+HLA-DR^+$, $CD34^+CD45^{low}CD143^+$. Суммарно выполнено 252 исследования ПК и ЛК.

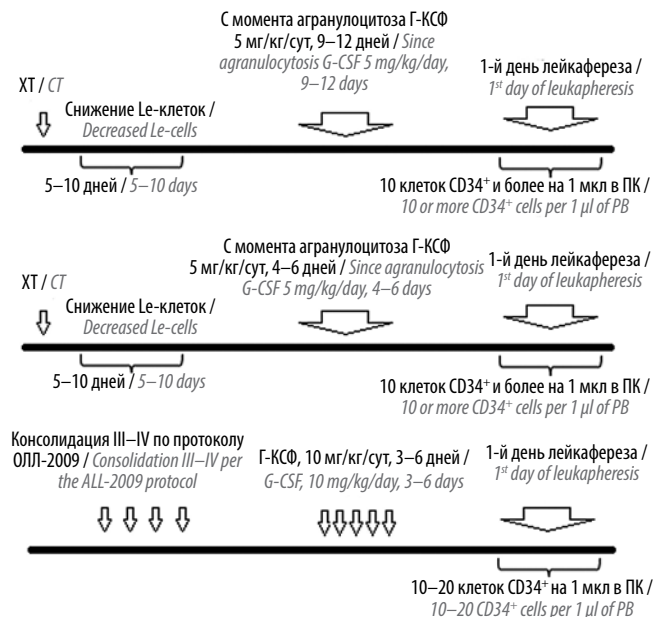


Рис. 1. Варианты мобилизации и сбора стволовых кроветворных клеток. ХТ – химиотерапия; Le – лейкоциты; Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ПК – периферическая кровь; Т-ОЛЛ – острый Т-лимфобластный лейкоз

Fig. 1. Types of hematopoietic stem cell mobilization and collection. CT – chemotherapy; Le – leukocytes; G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; PB – peripheral blood; T-ALL – T-cell acute lymphoblastic leukemia

Таблица 1. Общая характеристика больных

Table 1. Patient characteristics

Диагноз Diagnosis	n	Соотношение мужчин и женщин Ratio between men and women	Средний возраст (диапазон), лет Mean age (range), years	Полная ремиссия, n Full remission, n	Очень хороший частичный ответ, n Very good partial response, n	Частичная ремиссия, n Partial remission, n	Прогрессия, рецидив, n Progression, recurrence, n
Множественная миелома Multiple myeloma	53	27/26	54 (35–67)	12	25	15	1
Лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin lymphomas	20	9/11	44,5 (22–64)	3	—	12	5
T-лимфобластный лейкоз T-cell acute lymphoblastic leukemia	7	4/3	33 (19–62)	7	—	—	—

Определение экспрессии исследуемых популяций клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Beckton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител к антигенам CD34 (8G12 – PE), CD45 (2D1 – FITC), CD38 (HIT2 – PerCP-Cy5.5), HLA-DR (L243 – PE-Cy7), CD143 (BB9 – APC) производства Beckton Dickinson (США). Перед окраской клеточной суспензии с помощью моноклональных антител клетки ПК и ЛК освобождали от эритроцитов методом лизиса и отмывки. Лизис проводили с помощью лизирующего раствора ParmLyse (Becton Dickinson, США) в течение 5–7 мин.

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6. Проверку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные представляли в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Для сравнения значений

доли субпопуляций СКК применяли критерий Краскела–Уоллиса (для ненормальных распределений). Для множественных сравнений использовали поправку Данна. Наличие корреляции субпопуляций стволовых клеток с возрастом, количеством предшествующих курсов ХТ оценивали с помощью расчета коэффициента Пирсона (для нормально распределенных величин) или Спирмена (для ненормально распределенных величин).

Результаты

Нами было оценено количество клеток CD34⁺CD45^{low} и CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ в ПК перед мобилизацией и после нее и в ЛК у всех больных, включенных в исследование (табл. 2).

Больные ММ были разделены на 2 группы: 1-я группа с режимом мобилизации «ХТ + Г-КСФ», 2-я – «Г-КСФ в монорезиме».

Таблица 2. Количество клеток CD34⁺CD45^{low} и CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ в периферической крови перед мобилизацией и после нее и в лейкоконцентратах у больных гемобластомами

Table 2. CD34⁺CD45^{low} and CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ cell counts in peripheral blood before and after mobilization and in leukocyte concentrates of patients with hemoblastoses

Клетки Cells	Периферическая кровь, % Peripheral blood, %		Лейкоконцентраты, % Leukocyte concentrates, %
	перед мобилизацией prior to mobilization	после мобилизации after mobilization	
CD34 ⁺ CD45 ^{low}	0,04 ± 0,01	0,65 ± 0,09*	1,40 ± 0,18**
CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD143 ⁺	10,44 ± 1,21	45,70 ± 1,76*	45,52 ± 1,85

*Наличие достоверных различий в периферической крови до мобилизации и после нее.

**Наличие достоверных различий в периферической крови после мобилизации и в лейкоконцентратах.

*Significant differences in peripheral blood before and after mobilization.

**Significant differences in peripheral blood after mobilization and in leukocyte concentrates.

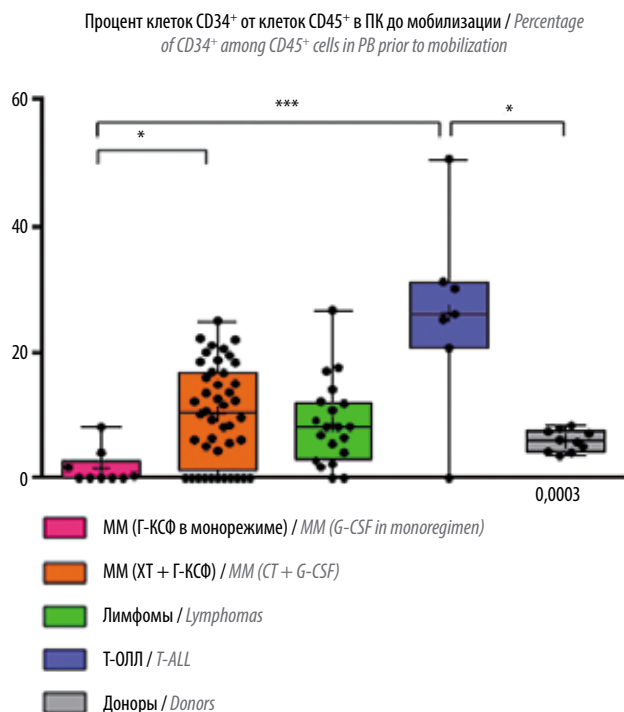


Рис. 2. Количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ в периферической крови (ПК) до мобилизации стволовых кроветворных клеток у больных множественной миеломой (ММ), лимфомами, острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ), доноров. Звездочками указано наличие достоверных различий между группами пациентов (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ХТ – химиотерапия

Fig. 2. $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ cell counts in peripheral blood (PB) prior to mobilization of hematopoietic stem cells in patients with multiple myeloma (MM), lymphoma, T-cell acute lymphoblastic lymphoma (T-ALL), donors. Asterisks denote significant differences between the patient groups (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; CT – chemotherapy

Выявлены достоверно значимые различия в количестве клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ у больных ММ в зависимости от режима мобилизации. У больных с режимом мобилизации «ХТ + Г-КСФ» количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ было больше, чем у больных с мобилизацией «Г-КСФ в монорегиме» в ПК перед мобилизацией (рис. 2).

В ПК перед мобилизацией не выявлено существенных различий в количестве клеток $CD34^+CD45^{low}$ у больных ММ, лимфомами, Т-ОЛЛ и доноров (рис. 3). У больных Т-ОЛЛ количество клеток $CD34^+CD45^{low}$ было незначительно больше, чем у других групп больных и доноров, однако статистически значимых различий не получено. Выявлены различия экспрессии АПФ на клетках $CD34^+CD45^{low}$. Количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ перед мобилизацией было достоверно больше у больных лимфомами, чем у больных ММ, Т-ОЛЛ и у доноров.

В образцах ПК перед мобилизацией не определено существенных различий в числе клеток $CD34^+CD45^{low}CD38^{+/-}$, $CD34^+CD45^{low}HLA-DR^{+/-}$ у больных ММ, лимфомами, Т-ОЛЛ и у доноров.

В табл. 3 представлена динамика количества клеток $CD34^+CD45^{low}$ и субпопуляций СКК в ПК перед

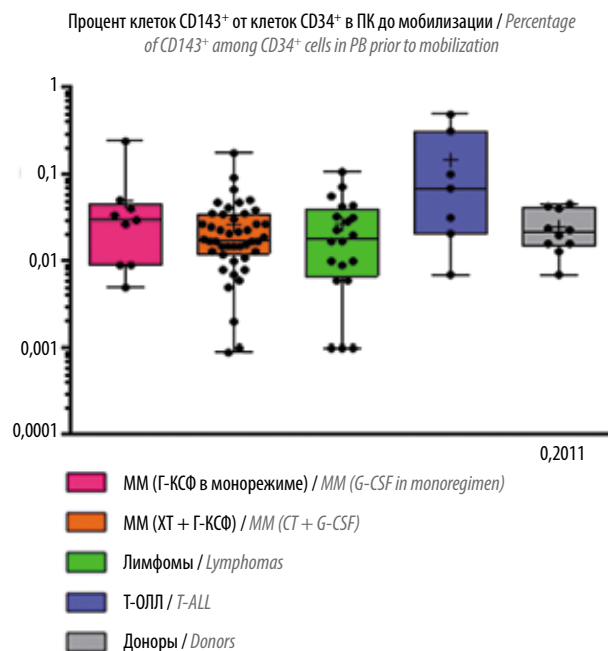


Рис. 3. Количество клеток $CD34^+CD45^{low}$ в периферической крови (ПК) до мобилизации стволовых кроветворных клеток у больных множественной миеломой (ММ), лимфомами, острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ), доноров. Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ХТ – химиотерапия

Fig. 3. $CD34^+CD45^{low}$ cell counts in peripheral blood (PB) prior to mobilization of hematopoietic stem cells in patients with multiple myeloma (MM), lymphoma, T-cell acute lymphoblastic lymphoma (T-ALL), donors. G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; CT – chemotherapy

мобилизацией и после нее и в ЛК у больных ММ, лимфомами, Т-ОЛЛ, доноров.

Количество клеток $CD34^+CD45^{low}$ у больных ММ (ХТ + Г-КСФ) и лимфомами было статистически значимо меньше в ПК перед мобилизацией, чем в ПК после мобилизации, в отличие от больных ММ (Г-КСФ в монорегиме), Т-ОЛЛ и доноров. В ЛК содержание клеток $CD34^+CD45^+$ было статистически значимо больше, чем в ПК перед мобилизацией у больных ММ (ХТ + Г-КСФ), лимфомами и Т-ОЛЛ.

У всех больных и у доноров содержание клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ статистически значимо ниже в ПК перед мобилизацией, чем в ПК после мобилизации и в ЛК. Выявлены достоверные различия в количестве клеток $CD34^+CD45^{low}CD38^+HLA-DR^-$ перед мобилизацией и после нее у больных ММ (ХТ + Г-КСФ) и лимфомами. Так, содержание этих клеток статистически значимо больше в ПК перед мобилизацией, чем в ПК после мобилизации и в ЛК. Поскольку соотношение субпопуляций СКК ($CD34^+CD45^{low}CD38^{+/-}HLA-DR^{+/-}$, $CD34^+CD45^{low}CD143^{+/-}$) в ПК после мобилизации и в ЛК было сопоставимым, дальнейшую оценку результатов проводили только в ЛК.

При исследовании СКК после мобилизации в ЛК выявлены различия в процентном содержании клеток $CD34^+CD45^{low}$ у различных больных и доноров. Так, у доноров их количество составило $0,17 \pm 0,08 \%$

Таблица 3. Динамика количества клеток CD34⁺CD45^{low} и субпопуляций стволовых кроветворных клеток в периферической крови перед мобилизацией и после нее и в лейкоконцентраатах у больных ММ, лимфомами, Т-ОЛЛ, доноров

Table 3. Dynamics of CD34⁺CD45^{low} cell counts and hematopoietic stem cell subpopulations in peripheral blood before and after mobilization and in leukocyte concentrates in patients with MM, lymphomas, T-ALL, donors

Группа пациентов Patients group	Материал исследования Studied material	Стволовые кроветворные клетки, % Hematopoietic stem cell, %	Субпопуляции стволовых кроветворных клеток, % Hematopoietic stem cell subpopulations, %				
		CD34 ⁺ CD45 ^{low}	CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD38 ⁻ HLA-DR ⁻	CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD38 ⁻ HLA-DR ⁺	CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD38 ⁺ HLA-DR ⁻	CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	CD34 ⁺ CD45 ^{low} CD143 ⁺
ММ (ХТ + Г-КСФ) MM (CT+G-CSF)	ПК перед мобилизацией PB before mobilization	0,03 ± 0,01*	0	0,02 ± 0,02	9,12 ± 1,2*	88,21 ± 2,38	10,25 ± 1,18*
	ПК после мобилизации PB after mobilization	0,8 ± 0,15*	0	0,12 ± 0,04	2,63 ± 0,44*	97,08 ± 0,43	53,7 ± 1,62*
	ЛК LC	1,47 ± 0,22**	0	0,2 ± 0,07	3,13 ± 0,7**	96,05 ± 0,92	53,11 ± 1,62**
ММ (Г-КСФ в монорежиме) MM (G-CSF monoregimen)	ПК перед мобилизацией PB before mobilization	0,05 ± 0,03	0	0	5,22 ± 1,9	94,78 ± 1,9	1,57 ± 0,93*
	ПК после мобилизации PB after mobilization	0,19 ± 0,1	0	0	4,59 ± 1,04	95,39 ± 1,05	28,53 ± 6,19*
	ЛК LC	0,37 ± 0,15	0	0	3,17 ± 0,93	96,84 ± 0,3	23,1 ± 6,21**
Лимфомы Lymphomas	ПК перед мобилизацией PB before mobilization	0,03 ± 0,01*	0,08 ± 0,04	0,47 ± 0,22	8,43 ± 1,14*	91,16 ± 1,17	8,65 ± 1,49*
	ПК после мобилизации PB after mobilization	0,78 ± 0,22*	0,05 ± 0,02	0,84 ± 0,28	3,81 ± 0,94*	95,13 ± 0,97	39,6 ± 3,04*
	ЛК LC	1,84 ± 0,46**	0,07 ± 0,03	0,73 ± 0,2	3,26 ± 0,67**	95,94 ± 0,78	41,5 ± 3,5**
Т-ОЛЛ T-ALL	ПК перед мобилизацией PB before mobilization	0,15 ± 0,07*	0	0	7,47 ± 2,01	92,4 ± 2,0	26,3 ± 5,67*
	ПК после мобилизации PB after mobilization	0,37 ± 0,13	0,09 ± 0,04	0,33 ± 0,15	4,13 ± 0,65	95,67 ± 0,68	39,8 ± 2,28*
	ЛК LC	1,28 ± 0,07**	0,36 ± 0,22	0,33 ± 0,13	5,29 ± 1,41	94,03 ± 1,72	43,7 ± 3,29**
Доноры Donors	ПК перед мобилизацией PB before mobilization	0,03 ± 0,01	0	0	7,23 ± 1,36	92,77 ± 1,36	6,13 ± 0,57*
	ЛК LC	0,17 ± 0,08	0,11 ± 0,07	0,41 ± 0,23	10,92 ± 1,9	88,55 ± 1,94	20,4 ± 3,22**

*Наличие достоверных различий в периферической крови до мобилизации и после нее.

**Наличие достоверных различий в периферической крови перед мобилизацией и в лейкоконцентраатах.

*Significant differences in peripheral blood before and after mobilization.

**Significant differences in peripheral blood before mobilization and leukocyte concentrates.

Примечание. ММ – множественная миелома; ХТ – химиотерапия; Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ПК – периферическая кровь; ЛК – лейкоконцентраты; Т-ОЛЛ – Т-лимфобластный лейкоз.

Note. MM – multiple myeloma; CT – chemotherapy; G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; PB – peripheral blood; LC – leukocyte concentrate; T-ALL – T-cell acute lymphoblastic leukemia.

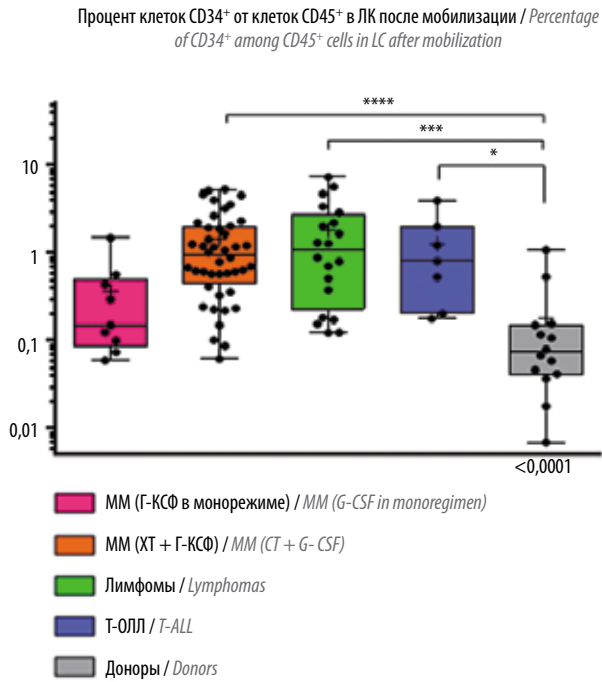


Рис. 4. Количество клеток CD34⁺CD45^{low} в лейкоконцентратах (ЛК) у больных множественной миеломой (ММ), лимфомами, острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ), доноров. Звездочками указано наличие достоверных различий между группами пациентов (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). ЛК – лейкоконцентраты; Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ХТ – химиотерапия

Fig. 4. CD34⁺CD45^{low} cell counts in leukocyte concentrates (LC) in patients with multiple myeloma (MM), lymphoma, T-cell acute lymphoblastic lymphoma (T-ALL), donors. Asterisks denote significant differences between the patient groups (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). LC – leukocyte concentrates; G-CSF – granulocyte colony-stimulating factor; CT – chemotherapy

и было статистически значимо ниже, чем у больных лимфомами, Т-ОЛЛ, ММ (ХТ + Г-КСФ) – $1,84 \pm 0,46$; $1,28 \pm 0,51$ и $1,47 \pm 0,22$ % соответственно ($p < 0,05$). Вероятно, эти различия обусловлены отсутствием у доноров цитостатического воздействия, предшествующего введению ростовых факторов. Достоверно значимых различий в содержании клеток CD34⁺CD45^{low} у доноров и больных ММ с мобилизацией «Г-КСФ в монорегиме» не выявлено (рис. 4).

Количество клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ в ЛК было меньше у доноров и больных ММ с мобилизацией «Г-КСФ в монорегиме», чем у больных лимфомами, Т-ОЛЛ и ММ (ХТ + Г-КСФ) ($p < 0,005$).

От 69,9 до 100 % мобилизованных стволовых клеток CD34⁺CD45^{low} экспрессировали CD38, HLA-DR. Процент клеток CD38⁺HLA-DR⁻ был статистически значимо больше в ПК до мобилизации СКК. После мобилизации увеличилось содержание CD38⁺HLA-DR⁺ (рис. 5).

Наиболее ранние клетки-предшественницы CD34⁺CD45^{low}, не экспрессирующие CD38 и HLA-DR, практически не выявлялись до мобилизации СКК и после нее. В ЛК у 1 больного Т-ОЛЛ обнаружено 1,5 % клеток CD34⁺CD45^{low}CD38⁻HLA-DR⁻.

Найдены различия в субпопуляции клеток CD34⁺CD45^{low}CD38⁻HLA-DR⁺ после мобилизации СКК в зависимости от диагноза. Так, содержание этой популяции клеток у больных лимфомами статистически достоверно больше, чем у больных ММ и Т-ОЛЛ ($p < 0,005$).

Для выявления связи полноты ответа на терапию (полная ремиссия, очень хороший частичный ответ,

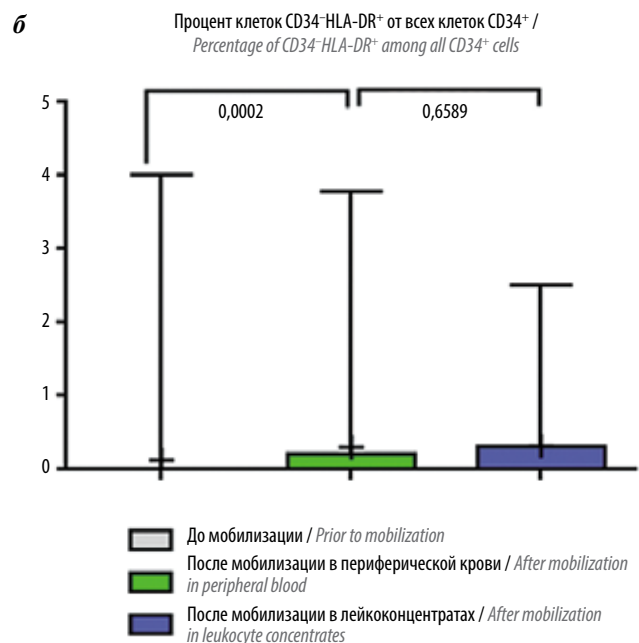
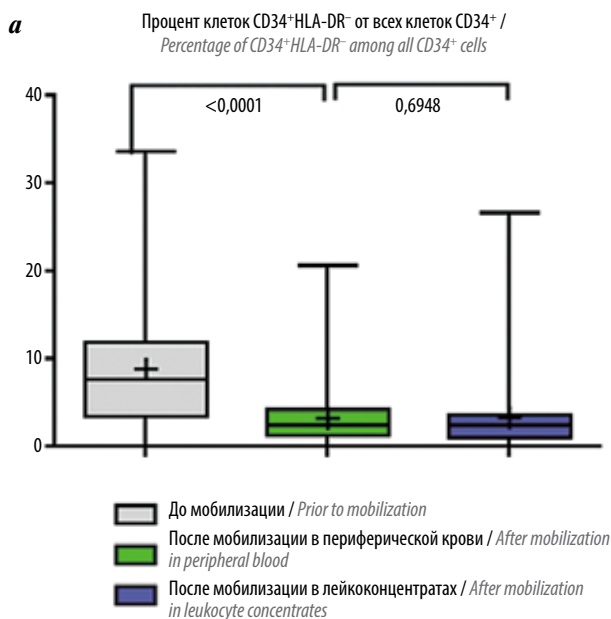


Рис. 5. Количество клеток CD34⁺CD45^{low}CD38⁺HLA-DR⁻ (а) и CD34⁺CD45^{low}CD38⁺HLA-DR⁺ (б) до мобилизации и после нее у больных и доноров

Fig. 5. CD34⁺CD45^{low}CD38⁺HLA-DR⁻ cell counts (a) and CD34⁺CD45^{low}CD38⁺HLA-DR⁺ cell counts (b) before and after mobilization in patients and donors

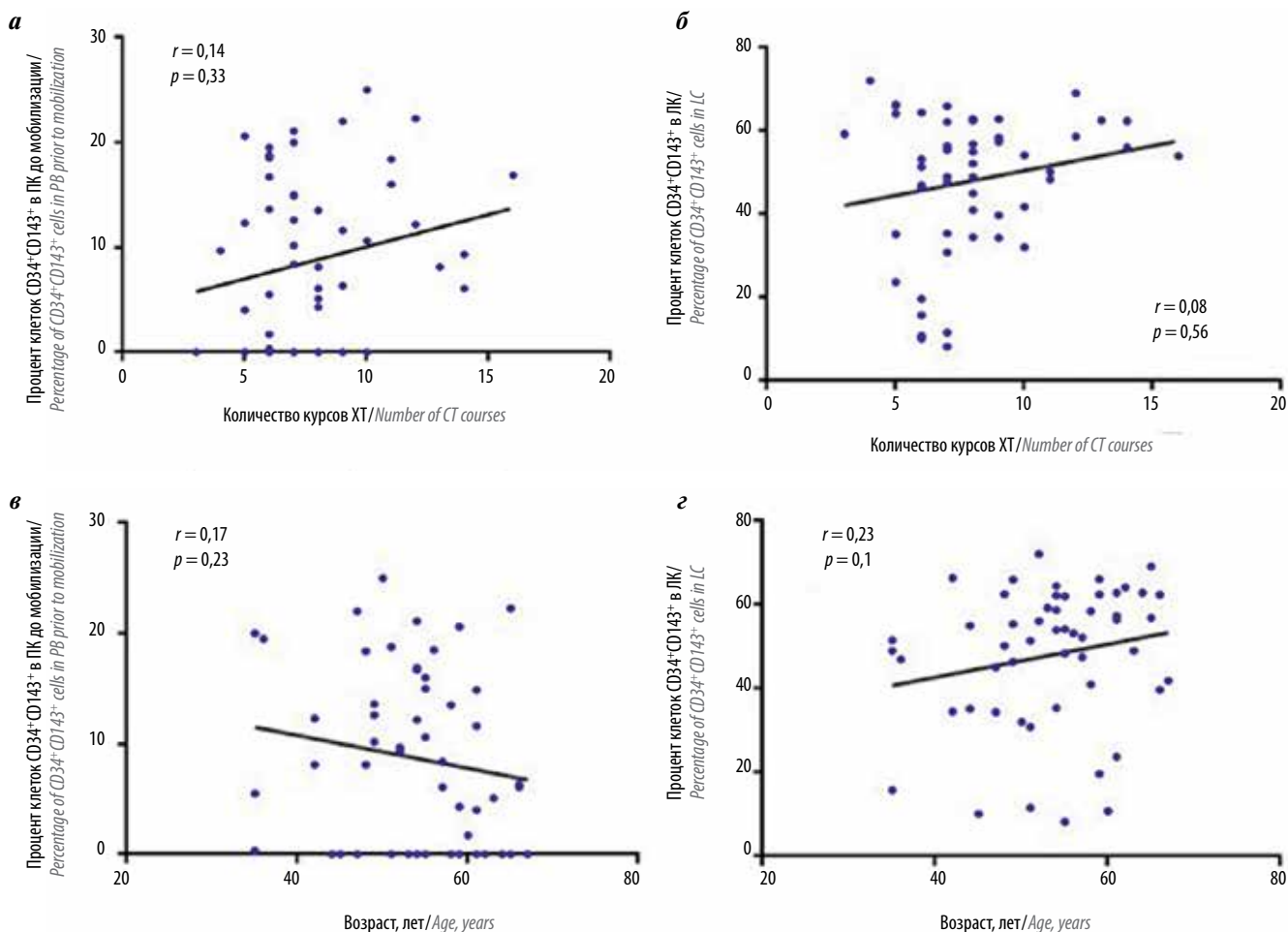


Рис. 6. Динамика количества клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ в периферической крови (ПК) до мобилизации (а, в) и в лейкоконцентраатах (ЛК) (б, г) в зависимости от числа курсов химиотерапии (ХТ) и возраста у больных множественной миеломой
Fig. 6. Dynamics of CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ cell counts in peripheral blood (PB) prior to mobilization (a, в) and in leukocyte concentrates (LC) (б, г) depending on the number of chemotherapy (CT) courses and age in patients with multiple myeloma

частичная ремиссия) с количеством клеток CD34⁺CD45^{low} и CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ была рассмотрена группа больных ММ. Число этих клеток в зависимости от полноты ответа достоверно не различалось как до мобилизации СКК, так и после нее. Также не выявлено статистически значимых различий содержания клеток CD34⁺CD45^{low}CD143⁺ у больных этой группы в зависимости от пола, возраста и количества курсов ХТ (рис. 6).

Обсуждение

Характеристика гемопоэтических клеток-предшественниц, которая необходима для выявления субпопуляций с наибольшим пролиферативным и дифференцировочным потенциалом, является одним из современных направлений в исследовании СКК.

Имеется достаточный объем данных о влиянии отдельных популяций стволовых клеток на скорость восстановления того или иного ростка кроветворения. Тем не менее до сих пор четко не определено, какая субпопуляция циркулирующих гемопоэтических клеток-предшественниц является значимой для раннего

и/или позднего посттрансплантационного восстановления кроветворения.

Антиген CD34 экспрессируется на всех этапах дифференцировки СКК. Показано, что при достаточной морфологической однородности клетки CD34⁺ гетерогенны по функциональным свойствам и пролиферативной активности. Репопулирующая способность и потенциал пролиферации снижаются по мере дифференцировки клетки от истинно стволовой до унипотентной [6]. Наиболее ранние СКК с неограниченным потенциалом пролиферации и дифференцировки были обнаружены в популяции клеток CD34⁺CD38⁻HLA-DR⁻, однако с учетом сложности их выделения многие исследователи изучали отдельно популяции CD34⁺CD38⁻ и CD34⁺HLA-DR⁻ [7–9, 14, 15].

Результаты исследований L.S. Rusten и соавт. показали, что субпопуляции клеток костного мозга как CD34⁺CD38⁻, так и CD34⁺HLA-DR⁻ являются примитивными гемопоэтическими клетками-предшественницами. Причем фракция клеток CD34⁺CD38⁻ содержит большее количество клеток ранних этапов

дифференцировки (популяция клеток, инициирующих рост долгосрочных клеточных культур костного мозга) с высоким потенциалом пролиферации, тогда как клетки $CD34^+HLA-DR^-$ содержат более выраженное количество эритроидных предшественниц [16]. Было показано, что эмбриональные костномозговые предшественницы $CD34^+CD38^-HLA-DR^+$ обладают свойствами истинно стоволовых кроветворных клеток и обеспечивают длительное и устойчивое восстановление как лимфоидных, так и миелоидных линий кроветворения, в отличие от популяции $CD34^+CD38^+HLA-DR^-$ [17, 18].

Поскольку клетки $CD34^+CD38^-HLA-DR^-$ являются наиболее ранней субпопуляцией СКК, следовательно, их пролиферация и дифференцировка требуют большего времени, чем пролиферация коммитированных клеток-предшественниц.

Аналогично предыдущим исследованиям [19] в нашей работе практически не выявлена фракция клеток $CD34^+CD45^{low}$, не экспрессирующих $CD38$ и $HLA-DR$. Только у 1 больного количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD38^-HLA-DR^-$ было более 1 %. Однако показано, что до мобилизации и после нее меняется субпопуляционный состав СКК. После мобилизации преобладают клетки $CD34^+CD45^{low}CD38^-HLA-DR^+$, т. е. с большим пролиферативным потенциалом, тогда как до мобилизации преобладают клетки $CD34^+CD45^{low}CD38^+HLA-DR^-$. Были выявлены различия в количестве клеток $CD34^+CD45^{low}CD38^+HLA-DR^-$ в зависимости от диагноза: описываемая популяция клеток была больше у пациентов с лимфомами, чем у пациентов с ММ и Т-ОЛЛ. Наиболее вероятным объяснением представляется отсутствие поражения костного мозга у большинства больных лимфомами, у 15 из 20 пациентов отсутствовало специфическое поражение костного мозга в дебюте заболевания.

Как уже было неоднократно ранее показано [20], статистически значимо большее количество клеток $CD34^+CD45^{low}$ в ПК после мобилизации и в ЛК было у больных, которым применялись режимы, сочетающие ХТ и Г-КСФ.

В 1996 г. I. C. Haznedaroglu и соавт. предположили, что в костном мозге есть локальная РАС, влияющая на рост, продукцию, пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток и участвующая в регуляции как нормального, так и патологического гемопоэза [21]. Это участие РАС в регуляции кроветворения может осуществляться либо с помощью прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки, либо через стимуляцию высвобождения факторов роста и цитокинов из стромальных клеток [22].

Компоненты РАС присутствуют даже в эмбриональном кроветворении. Изучение культур человеческих эмбриональных стволовых клеток показало,

что часть эндотелиальных и лимфогемopoэтических стволовых клеток с иммунофенотипом $CD143^+CD34^{+/-}CD45^-$ является гемангиобластами. После дифференцировки из гемангиобластов гемопоэтические клетки-предшественницы экспрессируют АПФ на всех стадиях гемопоэтического онтогенеза [23].

Нами была впервые изучена экспрессия АПФ на клетках $CD34^+CD45^{low}$ в ПК перед мобилизацией СКК и после нее и в ЛК. Показано, что $CD143$ экспрессируется на клетках $CD34^+CD45^{low}$ до и после мобилизации у всех пациентов и доноров, но количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ различалось в зависимости от диагноза и режимов мобилизации. После стимуляции кроветворения количество клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ увеличивалось, наряду с повышением количества клеток $CD34^+$, что может говорить об участии АПФ в пролиферации СКК.

Как количество клеток $CD34^+CD45^+$, так и экспрессия $CD143^+$ на клетках $CD34^+CD45^{low}$ были статистически значимо больше у больных, которым применяли режимы, сочетающие ХТ и Г-КСФ, чем у доноров и больных ММ с мобилизацией «Г-КСФ в монорежиме».

В нашем исследовании не выявлено корреляции статуса заболевания (полная ремиссия, очень хороший частичный ответ, частичная ремиссия) с количеством клеток $CD34^+CD45^{low}$ и $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ у больных ММ. Не установлены различия между количеством клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ у этой группы больных в зависимости от пола, возраста и числа курсов ХТ, предшествующих мобилизации СКК.

Заключение

Таким образом, показано увеличение содержания клеток $CD34^+CD45^{low}$, экспрессирующих АПФ ($CD143$) в ПК и ЛК у больных гемобластомами после мобилизации СКК. Подтверждено достоверно большее увеличение клеток $CD34^+CD45^{low}CD143^+$ у пациентов после мобилизации СКК с применением ХТ и Г-КСФ в отличие от мобилизации «Г-КСФ в монорежиме».

Среди мобилизованных СКК присутствует субпопуляция стволовых клеток с иммунофенотипом $CD34^+CD45^{low}CD38^-HLA-DR^+$, т. е. популяция клеток ранних этапов дифференцировки с высоким потенциалом пролиферации. Наиболее ранние клетки $CD34^+CD45^{low}$, не экспрессирующие $CD38$, $HLA-DR$, практически не были выявлены как до мобилизации, так и после нее.

Дальнейшее изучение иммунофенотипа популяций гемопоэтических СКК и сопоставление с клиническими данными, темпами и полнотой восстановления кроветворения позволят оценить роль каждой отдельной субпопуляции при трансплантации СКК.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133(1):157–64.
2. Shpall E.J., Champlin R., Glaspy J.A. Effect of CD34⁺ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol Blood Marrow Transplant* 1998;4(2): 84–92. DOI: 10.1053/bbmt.1998.v4.
3. Siena S., Bregni M., Brando B. et al. Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high dose cyclophosphamide treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1989;74:1905–14.
4. Allan D.S., Keeney M., Howson-Jan K. et al. Number of viable CD34⁺ cells rein fused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2002;29:967–72. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703575.
5. Thomas M.L. The leukocyte common antigen family. *Rev Immunol* 1989;7:339–69. DOI: 10.1146/annurev.iv.07.040189.002011.
6. Allan D.S., Keeney M., Howson-Jan K. et al. Number of viable CD34⁺ cells rein fused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2002;29:967–72. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703575.
7. Brandt J., Baird N., Lu L. et al. Characterization of a human hematopoietic progenitor cell capable of forming blast cell containing colonies *in vitro*. *Clin Invest* 1988;82(3):1017–23. DOI: org/10.1172/JCI113658.
8. Issaad C., Croisille L., Katz A. et al. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* 1993;81(11):2916–24.
9. Srour E.F., Brandt J.E., Briddell R.A. et al. Human CD34⁺ HLA-DR⁻ bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term *in vitro* hematopoiesis. *Blood Cells* 1991;17(2):287–95.
10. Paul M., Mehr A.P., Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol* 2006;86(3):787–803. DOI: 10.1152/physrev.00036.2005.
11. Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett* 2002;532(1–2):107–10.
12. Jokubaitis V.J., Sinka L., Driessen R. et al. Angiotensin converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal and adult hematopoietic tissues. *Blood* 2008;111(8):4055–63. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091710.
13. Dercksen M.W., Rodenhuis S., Dirkson M.K. et al. Subset of CD34⁺ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995;13:1922–32. DOI: 10.1200/JCO.1995.13.8.1922.
14. Brandt J., Briddell R.A., Srour E.F. et al. Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992;79:634–41.
15. Won E.J., Kim H.R., Park R.Y. et al. Direct confirmation of quiescence of CD34⁺CD38⁻ leukemia stem cell populations using single cell culture, their molecular signature and clinicopathological implications. *BMC Cancer* 2015;15:217–21. DOI: 10.1186/s12885-015-1233-x.
16. Rusten L.S. Functional differences between CD38⁻ and DR⁻ subfractions of CD34⁺ bone marrow cells. *Blood* 1994;84(5):1473–81.
17. Huang S., Terstappen L.W. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992;360(6406):745–9. DOI: 10.1038/360745a0.
18. Huang S., Terstappen L.W. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁻, CD38⁻ hematopoietic stem cells. *Blood* 1994;83(6):1515–26.
19. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Субпопуляции трансплантируемых стволовых кроветворных клеток. *Современная онкология* 2006;1:43–8. [Gritsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Subpopulations of transplantable hematopoietic stem cells. *Sovremennaya onkologiya = Contemporary Oncology* 2006;1:43–8. (In Russ.)].
20. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Гапонова Т.В. и др. Абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток CD34⁺ в периферической крови перед процедурой лейкофереза как параметр, прогнозирующий эффективность сбора стволовых клеток. *Терапевтический архив* 2017;89(7):18–24. DOI: 10.17116/terarkh201789718-24. [Galtseva I.V., Davydova Yu.O., Gaponova T.V. et al. The absolute number of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood before the leukapheresis procedure as a parameter predicting the efficiency of stem cell collection. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives* 2017;89(7):18–24. (In Russ.)].
21. Haznedaroğlu I.C., Tuncer S., Gürsoy M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. *Med Hypotheses* 1996;46(6):507–10.
22. Hubert C., Savary K., Gasc J.M. et al. The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(2):80–5. DOI: 10.1038/ncpcardio0449.
23. Zambidis E.T., Park T.S., Yu W. et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008;112(9):3601–14. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144766.

Вклад авторов

М.Л. Канаева: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, сбор и анализ данных литературы;
 И.В. Гальцева: интерпретация данных, участие в написании текста статьи;
 Е.Н. Паровичникова: разработка концепции, участие в написании текста статьи;
 Ю.О. Давыдова: анализ полученных данных;
 Т.В. Гапонова, Е.О. Грибанова, Л.А. Кузьмина, В.В. Троицкая, С.К. Кравченко, Е.Е. Звонков, Л.П. Менделеева: предоставление материалов для исследования;
 Я.Б. Бальжанова: обзор публикаций по теме статьи;
 В.Г. Савченко: научное редактирование, утверждение статьи.

Authors' contributions

M.L. Kanaeva: article concept and design development, article writing, collection and analysis of literature data;
 I.V. Galtseva: interpretation of data, participation in the writing of the article;
 E.N. Parovichnikova: article design development, participation in the writing of the article;
 Yu.O. Davydova: analysis of the obtained data;
 T.V. Gaponova, E.O. Gribanova, L.A. Kuzmina, V.V. Troitskaya, S.K. Kravchenko, E.E. Zvonkov, L.P. Mendeleeva: providing materials for research;
 Ya.B. Balzhanova: reviewing of publications on the article's topic;
 V.G. Savchenko: article editing, article approval.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.Л. Канаева/M.L. Kanaeva: <https://orcid.org/0000-0001-6840-6152>
И.В. Гальцева/I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
Е.Н. Паровичникова/E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
Ю.О. Давыдова/Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>
Т.В. Гапонова/T.V. Gaponova: <https://orcid.org/0000-0002-9684-5045>
Е.О. Грибанова/E.O. Gribanova: <https://orcid.org/0000-0002-4155-7820>
Я.Б. Бальжанова/Ya.B. Balzhanova: <https://orcid.org/0000-0001-8973-9407>
Л.А. Кузьмина/L.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>
В.В. Троицкая/V.V. Troitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4827-8947>
С.К. Кравченко/S.K. Kravchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7721-2074>
Е.Е. Звонков/E.E. Zvonkov: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
Л.П. Менделеева/L.P. Mendeleeva: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>
В.Г. Савченко/V.G. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.